

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **04166095 A**

(43) Date of publication of application: **11.06.92**

(51) Int. Cl

C12P 21/08
C07K 15/14
C12N 15/18
C12P 21/02
// C12N 5/20
C12N 15/06
(C12P 21/08 , C12R 1:91), (C12P
21/02 , C12R 1:19)

(21) Application number: **02287863**

(22) Date of filing: **25.10.90**

(71) Applicant: **TOSHIBA CORP**

(72) Inventor: **NAKAE HIROKI**

(54) **MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFICALLY
BINDING TO ASCIDIAN ENTACTIN, ASCIDIAN
ENTACTIN GENE AND ASCIDIAN ENTACTIN**

ascidian.

EXAMPLE: AS971.

(57) Abstract:

USE: Culture of ascidian cell.

NEW MATERIAL: The title antibody having homology with entactins or nidogens of rat and mouse, capable of dyeing a basement membrane in dyeing by fluorescent antibody technique and enzyme antibody method of tissue piece of ascidian, binding to a band of a protein wherein molecular weight is 120-180KD and isoelectric point is ≤ 7 , having a subclass of IgG₁ and capable of carrying out antigen-antibody reaction with a protein of

PREPARATION: A hybridoma obtained by fusing an antibody-producing cell taken out from a mammal immunized with a homogenate of body wall skin of ascidian with myeloma is cloned and cultured to prepare the objective antibody.

COPYRIGHT: (C)1992,JPO&Japio

⑫ 公開特許公報(A)

平4-166095

⑤ Int. Cl.⁵

C 12 P 21/08
C 07 K 15/14
C 12 N 15/18
C 12 P 21/02

識別記号

ZNA

庁内整理番号

8214-4B
7731-4H

④ 公開 平成4年(1992)6月11日

H

8214-4B
8717-4B
7236-4B

C 12 N 15/00
5/00

C
B※

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全 17 頁)

⑥ 発明の名称 ホヤエンタクチンに特異的に結合するモノクローナル抗体、ホヤエンタクチン遺伝子およびホヤエンタクチン

⑦ 特 願 平2-287863

⑧ 出 願 平2(1990)10月25日

⑨ 発 明 者 中 江 裕 樹 神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株式会社東芝総合研究所内

⑩ 出 願 人 株式会社東芝 神奈川県川崎市幸区堀川町72番地

⑪ 代 理 人 弁理士 鈴江 武彦 外3名

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

ホヤエンタクチンに特異的に結合するモノクローナル抗体、ホヤエンタクチン遺伝子およびホヤエンタクチン

2. 特許請求の範囲

(1) サブクラスが Ig G₁ であり、ラットおよびマウスのエンタクチンまたはナイドジェンと相同性を有し、かつホヤの蛋白質と抗原抗体反応を行なうことができるモノクローナル抗体であって、

a) この抗体を用いた、ホヤ組織切片の蛍光抗体法および酵素抗体法による染色において基底膜を染色し、かつ

b) ホヤ体壁筋索抽出物に対する、ウェスタンブロッティング法とこの抗体との組み合わせを用いた酵素抗体法またはラジオイムノアッセイにおいて、分子量が 120 KD ないし 180 KD であり、かつ等電点が 7 以下である蛋白質のバンドに結合するモノクローナル抗体。

(2) 下記アミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合する請求項1記載のモノクローナル抗体。

MetGluLysValAlaLeuCysMetLeuAlaValPheAlaValGlyHisSerLeuLeuVal
GluAspPheTyrProPheAspArgGluAsnAspAsnLeuValProLysGlyAspSerGlu
SerSerProGlnProLysThrPheTyrAlaAsnCysIleLeuArgSerGluTyrAspSer
ValThrValHisThrAspGlyLeuTyrLeuGluAsnValGlyAlaAspThrAspGlyGlu
ValLeuLeuAlaArgLeuGlyProThrGlyAspThrGluLeuSerGlyAspIlePhePhe
ArgGluHisLysAspAsnAlaThrIleAlaArgAlaAsnThrAspValArgGluAlaPhe
IleGluThrAlaGlyAspPheAsnAlaGlySerValPheValValThrTrpAspLysVal
GlnSerAlaSerArgGluAspGlyValThrPheThrPheGlnCysIleValAlaThrAsp
GlyAlaAlaThrPheAlaIlePheLeuTyrProGlnAspGlyLeuAlaValGlyGluAsn
AlaValLysGlyValArgAsnGluValThrAlaArgAlaGlyPheAsnAspGlyGlyArg
GluGlnLeuGluPheTyrArgLeuThrSerTyrLeuValValThrMetGlnValProArg
GlnTrpPheGlnIle

(ここで、Alaはアラニン、Argはアルギニン、Asnはアスパラギン、Aspはアスパラギン酸、Cysはシステイン、Glnはグルタミン、Gluはグルタミン酸、Glyはグリシン、Hisはヒスチジン、Ileはイソロイシン、Lysはリシン、Leuはロイシン、Metはメチオニン、Pheはフェニルアラニン、Proはプロリン、Serはセリン、Thrはトレオニン、Trpはトリプトファン、Tyrはチロシン、

および Val はバリンをそれぞれ表わす)

(3) 下記塩基配列を有する、ホヤエンタクチンを発現する遺伝子。

```

1      11      21      31      41
ATGGAAGAAGG TAGCGTTGTG TATGCTAGCA GTATTTGCTG TTGGACATTG
TACCTCTTCC ATCGCAACAC ATACGATCGT CATAAACGAC AACCTGTAAG

51      61      71      81      91
GCTACTTGTG GAAGATTTC TATCGTTCTG CCGGGAAGAC GACAACTTAG
CGATGAACAC CTTCTAAAGA TAGGCAAGCT GGCCTTTTGT CTGTTGAATC

101     111     121     131     141
TACCAAAAGG CGATAGTGAA AGTTCACCTC AACCAAAAAC TTTCTATGCC
ATGGTTTTCG GCTATCACTT TCAAGTGGAG TTGGTTTTTG AAAGATACGG

151     161     171     181     191
AATTGTATTC TACGATCAGA ATATGACAGC GTAACCGTTC ATACAGATGG
TTAACAATAAG ATGCTAGTCT TATAGTGTGC CATTGGCAAG TATGTCTACC

201     211     221     231     241
TTTATACCTG GAAAACGTCG GAGCAGATAC AGACGGCGAG GTCCTGTTAG
AAATATGAAC CTTTTGCAGC CTCGTCTATG TCTGCCGCTC CAGAACAATC

251     261     271     281     291
CACGTTTAGG TCCGACTGGG GACACCGAGC TCTCGGGAGA TATCTTCTTC
GTGCAATACC AGGCTGACCC CTGTGGCTCG AGAGCCCTCT ATAGAAGAAG

301     311     321     331     341
AGAGAACACA AAGACAACGC TACTATAGCA AGGGCCAATA CCGACGTGAG
TCTCTGTGTG TTCTGTTCGG ATGATATCGT TCCCGGTTAT GGCTGCACTC

351     361     371     381     391
AGAAGCATTC ATTGAAACAG CAGGGGACTT CAATGCCGGC TCTGTCTTTC
TCTTCGTAAG TAACCTTTGTC GTCCCTGAA GTTACGGCCG AGACAGAAAC

```

- 3 -

MetGluLysValAlaLeuCysMetLeuAlaValPheAlaValGlyHisSerLeuLeuVal
GluAspPheTyrProPheAspArgGluAsnAspAsnLeuValProLysGlyAspSerGlu
SerSerProGlnProLysThrPheTyrAlaAsnCysIleLeuArgSerGluTyrAspSer
ValThrValHisThrAspGlyLeuTyrLeuGluAsnValGlyAlaAspThrAspGlyGlu
ValLeuLeuAlaArgLeuGlyProThrGlyAspThrGluLeuSerGlyAspIlePhePhe
ArgGluHisLysAspAsnAlaThrIleAlaArgAlaAsnThrAspValArgGluAlaPhe
IleGluThrAlaGlyAspPheAsnAlaGlySerValPheValValThrTrpAspLysVal
GlnSerAlaSerArgGluAspGlyValThrPheThrPheGlnCysIleValAlaThrAsp
GlyAlaAlaThrPheAlaIlePheLeuTyrProGlnAspGlyLeuAlaValGlyGluAsn
AlaValLysGlyValArgAsnGluValThrAlaArgAlaGlyPheAsnAspGlyGlyArg
GluGlnLeuGluPheTyrArgLeuThrSerTyrLeuValValThrMetGlnValProArg
GlnTrpPheGlnIle

(ここで、Alaはアラニン、Argはアルギニン、
Asnはアスパラギン、Aspはアスパラギン酸、
Cysはシステイン、Glnはグルタミン、Gluはグ
ルタミン酸、Glyはグリシン、Hisはヒスチジン、
Ileはイソロイシン、Lysはリジン、Leuはロイ
シン、Metはメチオニン、Pheはフェニルアラニ
ン、Proはプロリン、Serはセリン、Thrはトレ
オニン、Trpはトリプトファン、Tyrはチロシン、
および Val はバリンをそれぞれ表わす)

3. 発明の詳細な説明

- 5 -

```

401     411     421     431     441
TTGTTACCTG GGATAAAGTA CAAAGTGCTA GTCGAGAGGA CGGGGTCACA
AACAATGGAC CCTATTTTCAT GTTTCACGAT CAGCTCTCCT GCCCAGTGT

451     461     471     481     491
TTCACATTCC AGTGCATTGT CGCAACTGAC GGTGCGGCCA CTTTCGCAAT
AAGTGTAAGG TCACGTAACA GCGTTGACTG CCACGCCGGT GGAAGCGTTA

501     511     521     531     541
ATTTCTCTAT CCCCAGAGAC GTCTAGCGGT CGGAGAAAAA GCAGTGAAGG
TAAAGAGATA GGGGTTCTGC CAGATCGCCA GCCTCTTTTA CGTCACTTCC

551     561     571     581     591
GAGTAAGGAA TGAAGTAACA GCCCGAGCCG GGTTCATGA CGGAGGTGCA
CTCATTCCCTT ACTTCATTGT CCGGCTCGGC CCAAGTTACT GCCTCCAGCT

601     611     621     631     641
GAACAATTGG AATTCTATCG GCTGACGAGT TACTTGGTGG TGACAATGCA
CTTGTTAACC TTAAGATAGC CGACTGCTCA ATGAACCACC ACTGTTACGT

651     661     671
GGTTCCAAGG CAATGGTTTC AAATT
CCAAGGTTCC GTTACCAAGG TTTAA

```

(ここで、A はアデニン、C はシトシン、G はグ
アニンおよび T はチミンを表わす)

(4) 下記アミノ酸配列を有するホヤエンタク
チン。

- 4 -

[発明の目的]

(産業上の利用分野)

この発明は、ホヤ細胞を培養する際に有用なホ
ヤエンタクチンとそれに対するモノクローナル抗
体、およびホヤエンタクチンを発現する遺伝子に
関する。

(従来の技術)

エンタクチンは、1981年にカールリンらによっ
て見出された、マウス基底膜に存在する分子量
150 KD の硫酸化糖蛋白質である (J. Biol. Chem.,
256、5902-5214、1981)。このエンタクチンは
細胞の増殖を促進することが知られており、すで
に培養基板のコーティング等に使用されている。
また、1983年にティンブルらによってマウスのガ
ン細胞から見出されたナイドジェン (Eur. J. Biochem., 137、455-485、1983) もエンタクチンと
同一の蛋白質であることがわかっている。

これら、エンタクチンおよびナイドジェンを検
出するための抗血清はすでに調製されている。ま
た、マウスの癌細胞とラット骨格筋とからそれぞ

- 6 -

れ構築した cDNA ライブラリを、この抗体を用いてスクリーニングすることにより、マウスおよびラットのエンタクチン遺伝子がそれぞれクローニングされている。さらに、クローニングされた遺伝子の配列を解析することにより、ラットエンタクチンの一部の配列とこれに対応する C 末端のアミノ酸配列 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1570-1574, 1987)、およびマウスエンタクチンの全遺伝子配列とこれに対応する全アミノ酸配列 (J. Cell Biol. 107, 2749-2756) が決定されている。

(発明が解決しようとする課題)

しかしながら、原素動物であるホヤには、エンタクチンの存在は知られてはいない。したがって、そのアミノ酸配列も知られてはおらず、さらにエンタクチンを発現する遺伝子のクローン化も全くなされていない。このため、動物間でのエンタクチンの比較検討も行なうことができない状態にある。

一般に、蛋白質を効率よく検出する方法として

— 7 —

この発明のモノクローナル抗体は、サブクラスが Ig G₁ であり、ラットおよびマウスのエンタクチンまたはナイドジェンと相同性を有し、かつホヤの蛋白質と抗原抗体反応を行なうことができるモノクローナル抗体であって、

a) この抗体を用いた、ホヤ組織切片の蛍光抗体法および酵素抗体法による染色において基底膜を染色し、かつ

b) ホヤ体壁筋素抽出物に対する、ウェスタンブロッティング法とこの抗体との組み合わせを用いた酵素抗体法またはラジオイムノアッセイにおいて、分子量が 120 KD ないし 180 KD であり、かつ等電点が 7 以下である蛋白質のバンドに結合することを特徴とする。

また、この発明によるホヤエンタクチンを発現する遺伝子は、下記塩基配列を有することを特徴とする。

は、目的とする蛋白質と特異的に結合する抗体を用いた抗原抗体反応を利用する方法が知られている。しかしながら、ホヤの場合には、エンタクチン自体の存在が知られていないので、エンタクチンに特異性を有する抗ホヤエンタクチン抗体も知られてはいない。このため、ホヤにおいてはエンタクチンを検出するための試薬がなく、局在するエンタクチンの検出や電気泳動で展開した蛋白質のバンドの同定を行なうことができない。また、エンタクチンが存在する基底膜の局在を調べることも困難である。

したがって、この発明は、ホヤエンタクチンに特異的に反応するモノクローナル抗体を提供することを目的とする。

また、この発明は、ホヤエンタクチンを発現する遺伝子を提供することをも目的とする。

さらに、この発明は、ホヤエンタクチンを提供することを目的とする。

[発明の構成]

(課題を解決するための手段および作用)

— 8 —

1	11	21	31	41
ATGGAGAAGG	TAGCGTTGTG	TATGCTAGCA	GTATTTGCTG	TTGGACATTG
TACCTCTTCC	ATCGCAACAC	ATACGATCGT	CATAAACGAC	AACCTGTAAG
51	61	71	81	91
GCTACTTGTG	GAAGATTTC	ATCCGTTTCA	CCGGGAAAAAC	GACAACTTAG
CGATGAACAC	CTTCTAAAGA	TAGGCAAGCT	GGCCCTTTTG	CTGTTGAATC
101	111	121	131	141
TACCAAAAGG	CGATAGTGAA	AGTTCACCTC	AACCAAAAAAC	TTTCTATGCC
ATGGGTTTCC	GCTATCACTT	TCAAGTGGAG	TTGGTTTTTG	AAAGATACGG
151	161	171	181	191
AATTGTATTC	TACGATCAGA	ATATGACAGC	GTAACCGTTC	ATACAGATGG
TTAACATAAG	ATGCTAGTCT	TATACTGTGC	CATTGGCAAG	TATGTCTACC
201	211	221	231	241
TTTATACTTG	GAACACGTGC	GAGCAGATAC	AGACGGCGAG	GTCTTGTTAG
AAATATGAAC	CTTTTGCAGC	CTCGTCTATG	TCTGCCGCTC	CAGAACAAATC
251	261	271	281	291
CACGTTTAGG	TCCGACTGGG	GACACCGAGC	TCTCGGAGAG	TATCTTCTTC
GTGCAAAATCC	AGGCTGACCC	CTGTGGCTCG	AGAGCCCTCT	ATAGAAGAAG
301	311	321	331	341
AGAGAACACA	AAGACAACGC	TACTATAGCA	AGGGCCAATA	CCGACGTGAG
TCTCTTGTGT	TTCTGTTGCG	ATGATATCGT	TCCCGGTTAT	GGCTGCACTC
351	361	371	381	391
AGAAAGCATT	ATTGAAACAG	CAGGGGACTT	CAATGCCGGC	TCTGTCTTTG
TCTTCGTAAG	TAACTTTGTG	GTCCCTGAA	GTTACGGCCG	AGACAGAAAC
401	411	421	431	441
TTGTTACCTG	GGATAAAGTA	CAAAGTGCTA	GTCGAGAGGA	CGGGGTGACA
AACAATGGAC	CCTATTTTCAT	GTTCACGAT	CAGCTCTCCT	GCCCCAGTGT

— 9 —

— 10 —

451 461 471 481 491
 TTCACATTCC AGTGCATTGT CGCAACTGAC GGTGCGGCCA CCTTCGCAAT
 AAGTGTAAGG TCACGTAACA GCGTTGACTG CCACGCCGGT GGAAGCGTTA

501 511 521 531 541
 ATTTCTCTAT CCCCAAGACG GTCTAGCGGT CGGAGAAAAT GCAGTGAAGG
 TAAAGAGATA GGGGTTCTGC CAGATCGCCA GCCTCTTTTA CGTCACCTTC

551 561 571 581 591
 GAGTAAGGAA TGAAGTAACA GCGCGAGCCG GGTTCATGA CGGAGGTGGA
 CTCATTCCCTT ACTTCATTGT CCGGCTCGGC CCAAGTTACT GCCTCCAGCT

601 611 621 631 641
 GAACAATTGG AATTCTATCG GCTGACGAGT TACTTGGTGG TGACAATGCA
 CTTGTTAACC TTAAGATAGC CGACTGCTCA ATGAACCACC ACTGTTACGT

651 661 671
 GGTTCGAAGG CAATGGTTTC AAATT
 CCAAGGTTCC GTTACCAAGG TTTAA

(ここで、A はアデニン、C はシトシン、G はグアニンおよび T はチミンを表わす)

また、この発明によるホヤエンタクチンは、下記アミノ酸配列を有することを特徴とする。

MetGluLysValAlaLeuCysMetLeuAlaValPheAlaValGlyHisSerLeuLeuVal
 GluAspPheTyrProPheAspArgGluAsnAspAsnLeuValProLysGlyAspSerGlu
 SerSerProGlnProLysThrPheTyrAlaAsnCysIleLeuArgSerGluTyrAspSer
 ValThrValHisThrAspGlyLeuLeuGluAsnValGlyAlaAspThrAspGlyGlu
 ValLeuLeuAlaArgLeuGlyProThrGlyAspThrGluLeuSerGlyAspIlePhePhe
 ArgGluHisLysAspAsnAlaThrIleAlaArgAlaAsnThrAspValArgGluAlaPhe

— 11 —

より作製することができる。

より詳細には、この発明のモノクローナル抗体は、下記の手順により作製することができる。

a) 抗体産生細胞の調製

この発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得るために、まず、ホヤ体壁筋のホモジネートを用いて哺乳動物を免疫感作する。ここで用いられる哺乳動物としては、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等の一般に用いられる実験動物を使用することができるが、マウスを用いることが好ましい。免疫感作は、例えばマウスの腹腔もしくは皮下等に、免疫原としてのホヤ体壁筋のホモジネートを接種することにより行なう。1 回当たりの接種量は免疫原 0.2ml/マウス程度とし、これを等量のアジュバントと混和して懸濁液としたものを用いる。これを 1~2 週間ごとに数回繰り返す。最終免疫は、0.2~0.4ml/マウスの免疫原をそのまま静脈内もしくは腹腔内に注射することにより行なう。最終免疫のための注射の 3~4 日後に脾臓を摘出し、抗体産生細胞として

— 13 —

IleGluThrAlaGlyAspPheAsnAlaGlySerValPheValValThrTrpAspLysVal
 GlnSerAlaSerArgGluAspGlyValThrPheThrPheGlnCysIleValAlaThrAsp
 GlyAlaAlaThrPheAlaIlePheLeuTyrProGlnAspGlyLeuAlaValGlyGluAsn
 AlaValLysGlyValArgAsnGluValThrAlaArgAlaGlyPheAsnAspGlyGlyArg
 GluGlnLeuGluPheTyrArgLeuThrSerTyrLeuValValThrMetGlnValProArg
 GlnTrpPheGlnIle

(ここで、Ala はアラニン、Arg はアルギニン、Asn はアスパラギン、Asp はアスパラギン酸、Cys はシステイン、Gln はグルタミン、Glu はグルタミン酸、Gly はグリシン、His はヒスチジン、Ile はイソロイシン、Lys はリシン、Leu はロイシン、Met はメチオニン、Phe はフェニルアラニン、Pro はプロリン、Ser はセリン、Thr はトレオニン、Trp はトリプトファン、Tyr はチロシン、および Val はバリンをそれぞれ表わす)

この発明のモノクローナル抗体は、ホヤ体壁筋のホモジネートで免疫された哺乳動物から取り出した抗体産生細胞と、適当な動物の腫瘍細胞、例えばミエローマとを融合させて目的とする抗体を産生する融合細胞(ハイブリドーマ)を調製し、この融合細胞をクローン化した後培養することに

— 12 —

利用する。

b) 腫瘍細胞の調製

腫瘍細胞としては、通常、ミエローマ細胞が用いられる。腫瘍細胞の由来は特に限定されるものではなく、マウス、ラット、ウサギ、ヒト等の哺乳動物の細胞株を使用することができるが、マウスの細胞株であることが好ましい。一般には、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損(HGPRT⁻)またはチミジンキナーゼ欠損(TK⁻)などの適当な選択マーカーを有する腫瘍細胞株が用いられる。このような細胞株には、例えば P3-X63-Ag8、P3-X63-Ag8-U1、SP20-Ag14、X63-Ag8-6.5.3 がある。これらの腫瘍細胞は、8-アザグアニン抵抗性の細胞株であり、HAT 培地中では生育することができない。

c) 細胞融合

細胞融合の際に用いられる培地としては、通常用いられるイーグル最小基本培地(MEM)、ダルベッコの改良 MEM、ロズウェル・パーク・メモリアル・インスティテュート(RPMI) 1640 等に、10

— 14 —

% CS (仔ウシ血清)、5% FCS (ウシ胎児血清) + 5% CS または 10% FCS を添加したものが使用される。親細胞の通常の維持の際には上記のいずれの培地でもよいが、ハイブリドーマを作製する際には 10% FCS を添加することが好ましい。細胞融合は、融合促進剤の存在下で、親細胞であるミエローマ等の腫瘍細胞と免疫感作された脾細胞 (抗体産生細胞) とを 1:5 ~ 1:20 の割合で混合することにより行なう。融合促進剤としては、HVJ (Hemmagglutinating Virus of Japan)、ポリエチレングリコール (PEG) 等が使用される。特に、30~50% の PEG1500 が好ましい。

d) ハイブリドーマの HAT 選択

融合後の細胞を 20% FCS 含有 RPMI1640 培地等で適当に希釈し、マイクロカルチャープレート (通常 96 ウェルまたは 24 ウェルのプレート) に $10^4 \sim 10^6 / 100 \mu\text{l}$ / ウェル程度植え付ける。その後、各ウェルに HAT 選択培地を添加し、通常 1 ~ 2 日毎に培地の交換を行ないながら培養する。腫瘍細胞として 8-アザグアニン抵抗性株を用いた場合に

- 15 -

リドーマを得ることができる。

g) モノクローナル抗体の取得

上記 f) で得られたハイブリドーマを培養容器中 (イン・ビトロ) または動物体内 (イン・ビボ) で培養することにより、モノクローナル抗体を産生させることができる。イン・ビトロで培養する場合、培地は上述の通常培地に CS もしくは FCS を添加したものを使用すればよい。この培地において 3 ~ 5 日間培養した後、培地上清から目的の抗体を得ることができる。イン・ビボで培養する場合には、例えば、使用したミエローマ細胞の起源となる動物と同系の動物に、プリスタン (2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン) 等の鉱物油を腹腔内投与し、その後少なくとも 1 週間以上経過してからハイブリドーマを腹腔内に接種する。ハイブリドーマの接種の後、7 ~ 14 日後に腹部に貯留している腹水を採取し、精製することにより、目的の抗体を得ることができる。

この発明のモノクローナル抗体を利用することにより、酵素または蛍光色素などでラベルされた

- 17 -

は、未融合のミエローマ細胞およびミエローマ-ミエローマ融合細胞は HAT 培地中においては 7 日程度で死滅する。また、脾細胞は正常細胞であるために寿命があり、イン・ビトロでは 2 週間以上は生育することができない。したがって、培養後 7 ~ 12 日目から生育する細胞はすべて脾-ミエローマ融合細胞であると考えられる。

e) ハイブリドーマのスクリーニング

ハイブリドーマのスクリーニングは、一般に、ELISA (Enzyme Linked-Immunoabsorbent Assay) 法、イムノブロット法等の公知の方法を用いて、ハイブリドーマが増殖したウェルの培養上清から目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを拾い上げることに由り行なう。

f) クローニング

各ウェル中には、異なる抗体を産生している 2 種類以上のハイブリドーマが生育している可能性がある。しかしながら、限界希釈法等によってクローニングを行なうことにより、最終的に目的のモノクローナル抗体を産生している単一のハイブ

- 16 -

抗マウス IgG 抗体等と組み合わせて、間接酵素抗体法、間接蛍光抗体法等により、ニトロセルロースに写しとった蛋白質群、ELISA プレートに吸着した蛋白質群、切片をはじめとする組織標本等からホヤエンタクチンのみを容易に検出することができる。このホヤエンタクチンは基底膜のよい指標となる蛋白質であることから、この発明のモノクローナル抗体を用いることにより、基底膜の局在をも検出することができる。

次に、この発明のホヤエンタクチンを発現する遺伝子 (ホヤエンタクチン遺伝子) は、*agl1* 等のベクターを用いてホヤ組織から調製した μ RNA で cDNA ライブラリを構築し、次いで、上述のホヤエンタクチンに特異的に結合する抗体 (抗ホヤエンタクチン抗体) を用いたスクリーニングにより cDNA ライブラリから目的の遺伝子断片が挿入されたベクターを選択し、選択したベクターを増幅させることにより得ることができる。

より詳細には、この発明のホヤエンタクチン遺伝子は、以下の手順に従って調製することができ

- 18 -

る。

h) cDNAライブラリの構築

まず、ホヤの組織を凍結させ、グアニジンチオシアネート溶液等の溶液に入れてホモジナイズする。ここで用いられるホヤ組織は、体壁筋であることが好ましい。得られたホモジネートを、22℃程度の注射針を通して CsCl 溶液上に重層した後遠心する。遠心により得られた RNA のベレットを RNA 溶解液で溶解し、フェノール-クロロホルム処理等により除蛋白した後、エタノール沈殿により RNA を回収する。回収した RNA はトリス緩衝液および SDS 溶液に溶解して全 RNA 溶液とする。この全 RNA 溶液から、例えばオリゴdTのアフィニティカラム等を用いて mRNA 画分を得ることにより精製する。次に、得られた mRNA 画分から cDNA を合成する。この cDNA の合成は、岡山-バーグ法等の公知の方法や、ストラテジーン社等から市販されているキットを利用して行なうことができる。最後に、得られた cDNA を適当なベクターに挿入することにより、

— 19 —

cDNA によって宿主細胞が産生した蛋白質がニトロセルロース膜に移しとられる。次に、このニトロセルロース膜に、上述の抗ホヤエンタクチン抗体、次いでこの抗ホヤエンタクチン抗体と特異的に結合し、かつ標識された抗体を反応させる。反応後、抗体の標識を検出に必要な処理を施して標識が存在するスポットを検出し、そのスポットに対応するブランクを検索することにより目的とするホヤエンタクチン遺伝子断片を有するベクターを得ることができる。

j) ホヤエンタクチン遺伝子を有するベクターの増幅

ホヤエンタクチン遺伝子断片を有することが確認されたベクターは、プレートライセート法、液体培養法等の方法で宿主細胞を培養することにより、増幅させることができる。

k) ホヤエンタクチン遺伝子の調製

まず、ホヤエンタクチン遺伝子断片を有するベクターがプラスミドである場合には上記 j) で増殖した宿主細胞をそのまま集め、ベクターがファ

cDNAライブラリを作製する。ここで用いられるベクターは、抗体スクリーニング用の発現ベクターであればどのようなものでもよいが、好ましくはファージ λgt11 である。cDNA を挿入したベクターがプラスミドである場合にはそのままでもよいが、ベクターがファージベクターである場合には挿入後パッケージングを行なうことが好ましい。

i) スクリーニング

まず、宿主細胞を適当な培地で培養し、上記 h) で調製したベクターを宿主細胞に導入する。宿主細胞としては大腸菌が好ましい。例えば、ベクターにファージベクター、宿主細胞に大腸菌をそれぞれ用いた場合には、大腸菌を LBH 培地等の適当な培地で培養し、この培養液とファージ液を混合した後、寒天培地等に広げてさらに培養してブランクを形成させる。次いで、形成されたブランク上にニトロセルロース膜を重ね、さらにインキュベートしてベクターに組み込んだ cDNA を発現させる。これにより、ベクターに組み込まれた

— 20 —

ージである場合には宿主細胞からファージのみを取り出して集める。次に、集めた宿主細胞またはファージを SDS 等を用いて破壊し、フェノール等で処理して除蛋白を行なう。除蛋白の後、エタノール沈殿を行なうことにより、ホヤエンタクチン遺伝子断片を含有する DNA を得ることができる。この DNA をさらに EcoRI 等の制限酵素で切断することにより、ホヤエンタクチンのみを得ることもできる。

この発明のホヤエンタクチンは、上記ホヤエンタクチン遺伝子を用いて調製することができる。より詳しく説明すると、例えば、市販のイン・ビトロ・エクスプレス・トランスレーション・キット (in vitro express translation kit; ストラテジーン社製) を利用するか、あるいはホヤエンタクチン遺伝子を有するファージを大腸菌に感染させ、この大腸菌の培養液を精製することによって得ることができる。

この発明のホヤエンタクチン遺伝子、およびこのホヤエンタクチン遺伝子を利用して得ることが

— 22 —

— 21 —

できるホヤエンタクチンにより、動物門間におけるエンタクチンの構造の比較検討を実施することが可能となる。また、この発明のホヤエンタクチンは、培養基板のコーティングに用いることもできる。

(実施例)

以下、この発明の実施例を説明する。

<実施例 1>

ホヤ体壁筋の蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製

(1) 免疫原の調製

以下に記載の調製操作は、特に断らない限りは、0~4℃で行なった。また、水もしくは他の溶液には、必要に応じて 0.5mM の蛋白質分解酵素阻害剤 PMSF (フェニルメタンスルホニルフルオリド) を添加した。

まず、ホヤ体壁筋に 2 倍量 (V/V) の冷水を添加してホモジナイズした。その後、最終的に 10 倍量となるように冷水を添加し、これを冷却遠心機を用いて 8000rpm で 10 分間遠心した。この遠心によ

- 23 -

り得られた沈殿をそのまま免疫原として用いることもできる。

た画分を硫酸分画 (3) と呼ぶ。これらの画分をそれぞれ 20 以上の緩衝液 B (20mM NaCl、0.1mM EDTA、15mM β -メルカプトエタノール、20mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 7.6)) に対して透析した。透析後の両画分を各々 SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) にかけて、クーマシーブリリアントブルー R250 で染色した後それぞれから分子量 10 万前後の数本のバンドを切り出した。ゲル内の蛋白質は、透析チューブ内に電気泳動を利用して抽出した。抽出した蛋白質は 20mM NaCl に対して透析し、必要に応じて遠心濃縮機で濃縮して免疫原とした。

(2) 動物の免疫

(1) で調製した免疫原とフロインド完全アジュバントとを等量ずつ 1ml シリンジにとり、ジョイントをつないで乳化するまでよく攪拌した後、マウスの腹腔内に注射してマウスを免疫した。マウスの免疫は 3 回行ない、基本的には、1 回目の免疫の 2 週間後に 2 回目の免疫、さらにその 2 週間後にブーストとしての免疫を行なった。ブースト

- 25 -

さらに、10 倍量の冷水を用いて、上記ホヤ体壁筋ホモジネートを上記と同様の操作で遠心して洗浄した。次に、この沈殿に、予め 37℃ に加熱しておいた緩衝液 A (4mM トリス、1mM EDTA、pH 8.5-9.0) を添加して 37℃ で 30 分間抽出した。次いで、8000rpm で 10 分間遠心し、0.5M の酢酸を用いて上清の pH を 7.0-7.2 に調製した後、1/100 量の 1M $MgCl_2$ を最終的に 10mM $MgCl_2$ となるように徐々に添加した。これを、氷冷したまま 15 分間攪拌し、次いで 8000rpm で 10 分間遠心して上清を採取した。採取した上清に硫酸アンモニウムを 0.15g/ml の割合で添加し、さらに 30 分間攪拌した後 8000rpm で 20 分間遠心して得られた沈殿を採取した。この沈殿として得られた画分を硫酸分画 (2) と呼ぶ。次に、この遠心により得られた上清にさらに 0.4g/ml の硫酸アンモニウムを添加し、上記と同様に 30 分間攪拌した後 8000rpm で 20 分間遠心して沈殿を採取した。この沈殿として得られ

- 24 -

の 3 日後には、細胞融合操作を行なった。日数を調整する必要がある場合には、ブーストを遅らせることにより調整した。また、抗体価は、免疫後 2~7 日後にマウスの尾の静脈から採血し、その血清を用いて後述のイムノブロット法を用いて検定した。

(3) 細胞融合

(2) の操作により免疫したマウスの頰椎を脱臼させ、脾臓を摘出した。この脾臓を 5ml の RPMI を入れた 6cm ディッシュに移して余分な脂肪等を除去し、さらに 5ml の RPMI を入れた 6cm ディッシュで 2 回洗浄した。この脾臓を、2 つに折った 5cm 角のステンレス製金網の間にピンセットで挟りつけ、脾臓をほぐして単独の細胞にした。この細胞をピペットで遠心管に移し、10ml の RPMI と共に遠心することにより洗浄した。この操作は 2 回繰り返した。遠心後、沈殿した細胞に 0.17M の NH_4Cl を添加して水中に 5 分間つけることにより溶血させた。溶血操作の後、5ml の RPMI を添加して 1600rpm で 5 分間遠心し、RPMI で洗浄した後

- 26 -

20 ml にメスアップして脾臓細胞懸濁液とした。

これとは別に、ディッシュ 2~4 枚分の、対数増殖期にあるミエローマを 1200rpm で 5 分間遠心することにより集め、血清を含有しない RPMI で 2 回洗浄し、最後に 10ml の RPMI に懸濁してミエローマ懸濁液とした。

上記脾臓細胞懸濁液およびミエローマ懸濁液の細胞数をカウントし、ミエローマの数が脾臓細胞の数の $1/5 \sim 1/20$ となるように脾臓細胞懸濁液にミエローマ懸濁液を添加し、その後 5 分間遠心して上清を除去した。次いで、得られた沈殿に、

0.3ml の 50% ポリエチレングリコール 1500 (75mM ヘベスに溶解したもの) を一度に添加し、直ちによく攪拌した。この際、攪拌を続けながら、さらに RPMI を添加した。この懸濁液を 1000rpm で

5 分間遠心し、得られた沈殿に HAT 培地 (最終濃度で $1 \times 10^{-7}M$ のヒポキサンチン、 $4 \times 10^{-4}M$ のアミノプテリン、 $18 \times 10^{-4}M$ のチミジンを含む RPMI-FCS) 50ml を添加した。得られた懸濁液を、2 枚の 24 ウェルプレートに 500 μ l/ウェルずつ

— 27 —

してスクリーニングしようとする培養上清をウェルに分注し、インキュベートの後除去した。次いで、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) でラベルしたヤギ抗マウス抗体をウェルに分注し、インキュベートして反応させた後除去した。それぞれの反応の後には、PBS でウェルを 4~5 回洗浄した。次に 50mM クエン酸および 100mM Na_2HPO_4 (pH 4.5~5.0) に溶解した 100 μ g/ml のオルトフェニレンジアミンに 1/500 量の過酸化水素水を添加し、この混合液をウェルに 100 μ l/ウェルずつ分注した。酵素反応を充分に行なって発色させた後、50 μ l/ウェルの 2M 硫酸を添加して反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで比色してポジティブクロンの検索を行なった。

検索の結果、強い活性が認められた培養上清を採取したウェルに対して、フィーダー細胞としてマウスの胸腺細胞を用い、限界希釈法によってクローニングを行なった。これにより 1 個のクローンを得、このハイブリドーマを培養することによ

— 29 —

つ、および約 3 枚の 96 ウェルプレートに約 100 μ l/ウェルずつ分注した。4~5 日後、24 ウェルプレートには約 1ml/ウェル、および 96 ウェルプレートには約 100 μ l/ウェルの HAT 培地をさらに添加した。その結果、約 1 週間で、ほとんどのウェルにハイブリドーマが増殖した。これらのハイブリドーマをさらに培養し、培養上清を ELISA 法またはイムノブロット法によるスクリーニングに用いた。

(4) ハイブリドーマの選定とクローニング

(1) で調製した免疫原を、総蛋白質量が数 100 μ g/ml となるように希釈して抗原溶液とし、96 ウェルプレートに 50 μ l/ウェルずつ分注してパラフィルム等でシールし、4℃で一晩静置した。次いで、抗原溶液を除去し、150 μ l/ウェルの、1% BSA (ウシ血清アルブミン) - TBS (トリス緩衝生理食塩水) 溶液を用いて、室温で 1 時間、もしくは 4℃で一晩インキュベートすることによりウェル表面をブロックした。その後、ウェルを PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で洗浄し、一次抗体と

— 28 —

りモノクローナル抗体を得た。このモノクローナル抗体を AS971 と命名した。

アマシャム社製のサブ・イソタイピング・キット (Sub Isotyping Kit) を用いて検討した結果、この抗体のサブクラスは IgG1 であることが判明した。

<実施例 2>

AS971 の反応特異性の検討

AS971 の反応特異性を、以下のようにイムノブロット法によって検討した。

まず、前述のホヤ体壁筋ホモジネートの SDS-PAGE もしくは 2 次元電気泳動を行ない、Townin らの方法 (1979) に従って、蛋白質を電気泳動的にニトロセルロース膜に写し取った。その後、SDS-PAGE を行なった場合には膜を短冊状に切断し、また 2 次元電気泳動を行なった場合には展開した周囲の膜を切り取って以後の処理に用いた。

SDS-PAGE の後に転写を行なった膜は、次に、3%ゼラチン-TBS 溶液を用いて、室温で 1 時間ないし一晩ブロックした。次に、一次抗体として

— 30 —

AS971と、二次抗体として HRPでラベルしたヤギ抗マウス抗体とそれぞれ反応させた。反応の後には、それぞれシャーレに入れた TBSで15分間 3回洗浄した。ラベルの検出は、50mMトリス-HCl (pH 7.5) に溶解した 100 μ g/ml ジアミノベンジジン 4塩酸塩に、1/100 量の 1% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ および 1% $(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、並びに 1/500 量の過酸化水素水を添加した発色液を用いて行なった。この発色液で充分に発色させた後、蒸留水で洗浄して乾燥させた。

これとは別に、上記と同様にしてニトロセルロース膜上に蛋白質を転写し、1% アミノブラック溶液で染色した後 7% 酢酸で脱色して蛋白質のバンドの検出を行なった。

2次元電気泳動の後に転写を行なった膜に対しては、まず、膜を 0.1% 酢酸で前処理した後、

0.2% ボンソー溶液 (0.5% 酢酸および 10mM CaCl_2 に溶解) で染色し、ポラロイドフィルムに撮影して検出を行なった。次いで、0.5N NaOHで脱色して蒸留水で洗浄した後、上記の SDS-PAGE

- 3 1 -

遺伝子組み換え技術を応用した公知の方法により、AS971を構成する蛋白質のアミノ酸配列を分析した。その結果、AS971には第3図に示すアミノ酸配列を有するペプチドが含まれることが明らかになった。この図においては、アミノ酸は3文字表記で表わされており、Alaはアラニン、Argはアルギニン、Asnはアスパラギン、Aspはアスパラギン酸、Cysはシステイン、Glnはグルタミン、Gluはグルタミン酸、Glyはグリシン、Hisはヒスチジン、Ileはイソロイシン、Lysはリシン、Leuはロイシン、Metはメチオニン、Pheはフェニルアラニン、Proはプロリン、Serはセリン、Thrはトレオニン、Trpはトリプトファン、Tyrはチロシン、および Valはバリンをそれぞれ表わす

第4図は、AS971が結合する蛋白質に含まれるペプチドのアミノ酸配列と、ラットエンタクチンに含まれるペプチドのアミノ酸配列とを並べて比較する図である。この図においては、アミノ酸は1文字表記で表わされており、Aはアデニン、C

- 3 3 -

を行なった場合と同様にして抗原抗体反応を行ない、抗原蛋白質の検出を行なった。

これらの結果を第1図、第2a図および第2b図に示す。第1図は、SDS-PAGEによるホヤ体壁筋ホモジネートの展開パターンおよびイムノプロット法による AS971の結合位置を示す写真である。この図において、1は分子量マーカーのアミドブラックによる染色パターン、2はホヤ体壁筋ホモジネートのアミドブラック染色パターン、および3はホヤ体壁筋ホモジネートに対する AS971を用いたイムノプロット法の結果をそれぞれ示す。この図より明らかなように、AS971は分子量約 150 KDの単一の蛋白質のバンドに反応する。

また、第2a図は2次元電気泳動によるホヤ体壁筋ホモジネートの展開パターンを示し、第2b図はイムノプロット法による AS971の結合位置を示す写真である。この図より明らかなように、AS971は分子量が約 150KDであり、等電点が pH 7より酸性側にある単一の蛋白質のスポットに反応する。

- 3 2 -

はシステイン、Dはアスパラギン酸、Eはグルタミン酸、Fはフェニルアラニン、Gはグリシン、Hはヒスチジン、Iはイソロイシン、Kはリシン、Lはロイシン、Mはメチオニン、Nはアスパラギン、Pはプロリン、Qはグルタミン、Rはアルギニン、Sはセリン、Tはトレオニン、Vはバリン、Wはトリプトファン、およびYはチロシンをそれぞれ表わし、左端の数字はその列の先頭のアミノ酸の番号を示す。また、左端の数字の肩にある“.”はその列が AS971が結合する蛋白質に含まれるペプチドのアミノ酸配列であることを示し、“.”はその列がラットエンタクチンに含まれるペプチドのアミノ酸配列であることを示している。さらに、この2つのアミノ酸配列において、列間の“*”は互いに同一のアミノ酸であることを、また“.”は互いに類似したアミノ酸であることを示している。この図より明らかなように、AS971が結合する蛋白質に含まれるペプチドとラットエンタクチンに含まれるペプチドとは高い相同性を有している。この結果から、AS971が結合す

- 3 4 -

る蛋白質は、ホヤエンタクチンであることが判明した。

<実施例 3>

ホヤエンタクチンおよび基板の局在の検出

ホヤエンタクチンおよび基板の局在の検出は、冷凍切片法によって行なった。まず、ホヤを $3 \times 3 \times 10 \text{ mm}$ 程度の柱状に切り取り、液体窒素で急冷して凍結した。これをクリオスタットミクロームで $4 \sim 8 \text{ }\mu\text{m}$ 厚の切片にした。次に、この切片をスライドガラス上でホルマリン (PBS で原液の 10% に希釈したものの) 固定し、PBS で洗浄した後、ブロック液 (1% BSA - PBS 溶液) でブロックした。次いで、ブロック液をろ紙を用いて除去し、一次抗体としての AS971、および二次抗体としての蛍光色素フルオレセインイソチオシアネート (FITC) でラベルしたヤギ抗マウス抗体とそれぞれ反応させた。この際、反応の後には、それぞれ PBS で洗浄した。その後、PBS で封入してマニキュアでシールし、ツァイス社製位相差蛍光顕微鏡で観察した。

- 35 -

した。ここで、フェノール-クロロホルム処理は、等量の TE を飽和になるまで混入させたフェノール、クロロホルムおよびイソアミルアルコールを 25:24:1 の比率で混合し、得られた溶液を RNA 溶解液に添加して 5 分間氷上で混合を続けた後、15,000rpm で 5 分間遠心し、最上層をフェノール-クロロホルム処理後の RNA 溶解液として回収することにより行なった。また、エタノール沈殿は、フェノール-クロロホルム処理後の RNA 溶解液に 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム水溶液、および両者の合計の 2~3 倍量のエタノールを添加し、次いで -80°C で 15 分間インキュベートして 15,000rpm で 5 分間遠心し、さらに得られた沈殿を 70% エタノールで洗浄して低圧下で乾燥させ、RNA を沈殿として回収することにより行なった。回収した RNA はトリス緩衝液および SDS 溶液に溶解して全 RNA とし、さらにこの全 RNA をオリゴ dT のアフィニティークラムを用いて精製して mRNA 画分とした。この mRNA 画分を用い、ストラテジーン社から市販されているキットを利

- 37 -

その結果を第 5 a 図および第 5 b 図に示す。第 5 a 図はホヤ体壁筋切片の位相差像、第 5 b 図はホヤ体壁筋切片の蛍光像をそれぞれ示す顕微鏡写真である。このように、AS971 を用いることにより、凍結切片上でエンタクチンの局在を視認することが可能となる。また、エンタクチンは基板に存在する蛋白質であるので、第 5 b 図に示す蛍光像は、ホヤ体壁筋における基板の局在をも同時に示している。

<実施例 4>

ホヤエンタクチン遺伝子の調製

(1) cDNA ライブラリの調製

まず、液体窒素を用いてホヤ組織 (体壁筋) を凍結し、組織 1g 当り 10ml の量のグアニジンチオシアネート溶液に入れてホモジナイズした。次に、得られたホモジネートを 22G の注射針を通して 1/3 容の CsCl 溶液の上に重層し、26000rpm で 20 時間以上遠心した。遠心後、RNA のペレットを RNA 溶解液で溶解し、フェノール-クロロホルム処理の後エタノール沈殿により RNA を回収

- 36 -

用して、cDNA を合成した。その後、ベクターとして抗体スクリーニング用の発現ベクター $\lambda \text{gt}11$ を用い、得られた cDNA をこのベクターに挿入してパッケージングを行なうことにより cDNA ライブラリーを作製した。

(2) モノクローナル抗体 AS971 によるブラークのスクリーニング

大腸菌 Y1090 ($\Delta \text{lacU169proA}^+ \Delta \text{lon araD139strAsupF}[\text{trpC22::Tn10}](\text{pHC9}^+)$ 、 mcrA^- 、 mcrB^-) を LBM 培地 (0.2% マルトースおよび 50mg/ml アンピシリンを含有) で一晚培養し、その培養液 0.6ml と 4×10^5 pfu 程度のスファージ液とを混合して室温で 20 分間インキュベートした。これとは別に、プレートに、表面積が約 200 cm^2 のボトムアガー (LBM アガー) を用意した。次に、オートクレーブ処理の後、溶融状態のまま 55°C でインキュベートしたトップアガロース (LBM アガロース) 7.5ml を上記混合液に添加して素早く攪拌し、上記ボトムアガー上に広げた。トップアガロースが固まった後、 42°C で 3.5 時間インキュベ

- 38 -

ートし、ブランクを形成させた。次いで、このブランク上にニトロセルロース膜を重ね、37℃で3.5時間インキュベートして大腸菌に導入されたcDNAを発現させた。このニトロセルロース膜は、予め10mM IPTG (イソプロピルチオガラクトピラノシド) に浸した後、乾燥させたものである。その後、ニトロセルロース膜をTBSで洗浄し、以後の抗原抗体反応に用いた。

AS971を用いたスクリーニングは、以下の通りに行なった。まず、3%ゼラチンを含有する

TBSを用いて室温で1時間ないし一晩、上記ニトロセルロース膜のブロッッキングを行なった。次に、一次抗体としてのAS971、および二次抗体としてのHRPでラベルしたヤギ抗マウス抗体とそれぞれ反応させた。この際、それぞれの反応の後には、TBSで15分ずつ3回洗浄した。ラベルの検出は、50mMトリス-HCl (pH 7.5) に1/100量の1% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ および1% $(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、並びに1/500量の過酸化水素水を添加した発色液を用いて発色させることにより行

— 39 —

cmプレートのボトムアガー (LBMアガー) 上に広げた。トップアガロースが固まった後、ビニール袋に入れ、37℃で6~7時間培養した。大腸菌が溶菌した後、SM緩衝液5mlおよびクロロホルム数滴を添加し、SM緩衝液が表面を完全に覆うように水平に保ちながら4℃で一晩インキュベートした。これにより、ホヤエンタクチン遺伝子およびその相補鎖を含むファージがSM緩衝液中に分散する、ファージ懸濁液が得られた。

また、以下の手順で、液体培養法を用いたファージの増殖も行なった。

ホヤエンタクチン遺伝子およびその相補鎖を有するファージ液を $10^6 \sim 10^7$ pfu / 100 μl SMに希釈した。この希釈液100 μl に、一晩培養した大腸菌Y1088を20 μl 添加して37℃で15分間インキュベートした後、LBM培地5mlをさらに添加して37℃で一晩振とう培養した。その後、クロロホルム100 μl を添加して15分間振とうした後、3000rpmで10分間遠心した。得られた上清をファージ液として用いた。

— 41 —

なった。この発色液で充分に発色させた後、蒸留水で洗浄し、乾燥させた。これによりポジティブブランクを選出し、1つのポジティブなファージを得た。このファージが有するDNAにはホヤエンタクチン遺伝子が含まれている。

(3) ホヤエンタクチン遺伝子およびその相補鎖を有するファージの増殖

(2) で得られたホヤエンタクチン遺伝子およびその相補鎖を有するファージを、プレートライセート法を用いて以下の手順で増殖させた。

まず、大腸菌Y1088 ($\Delta \text{lacU169supEsupFhsdR}^- \text{hsdM}^+ \text{melBtrpRtonA21[proc::Tn5]}(\text{pMC9})$ 、 $\text{mc rA}^- \text{mcrB}^+$) をLBM培地 (0.2% マルトース、50 mg/ml アンピシリンを含有) で一晩培養し、その培養液に $10^5 \sim 10^6$ pfu のファージを含有する

SM緩衝液0.1mlを添加して37℃で10分間インキュベートした。この混合液に、オートクレープ処理した後、溶融状態のまま55℃でインキュベートしておいたトップアガロース (LBMアガロース)

2.5mlを添加して素早く攪拌し、予め用意した10

— 40 —

(4) ホヤエンタクチン遺伝子およびその相補鎖の調製

(3) で得られたホヤエンタクチン遺伝子およびその相補鎖を有するファージ液に、RNアーゼAおよびDNアーゼIをそれぞれ5 μg /mlとなるように添加し、37℃で30分間インキュベートした。次に、等量のポリエチレングリコール PEG6000 - 2M NaCl溶液を添加して混合した後、0℃で1時間インキュベートした。この混合液を、4℃かつ

3000rpmで20分間遠心した後、上清を完全に除去し、沈殿をSM緩衝液0.5mlで懸濁してエッペンドルフチューブに移した。これを8000rpmで2分間遠心し、得られた上清を別のエッペンドルフチューブに移した。このエッペンドルフチューブに、EDTAおよびSDSを、それぞれ10mMおよび0.1%となるように添加して65℃で15分間インキュベートした。その後、フェノール抽出を1回、フェノール-クロロホルム抽出を2回、およびクロロホルム抽出を1回それぞれ穏やかに行なった。この抽出の際には、TE (トリス-EDTA緩衝液) で飽

— 42 —

和されたフェノールを用いた。これらの抽出により得られた水層に、3M 酢酸ナトリウム 50 μ l およびエタノール 1ml を添加して -80℃で15分間インキュベートし、15000rpmで5分間遠心した。遠心の後、上清を捨てて得られた残渣を冷70%エタノールですすぎ、乾燥させた後、TE 50 μ l に再び溶解してホヤエンタクチンおよびその相補鎖を有するファージDNAを得た。

このDNAからは、*Eco* RI等の制限酵素を用いることにより、エンタクチン遺伝子およびその相補鎖を切り出すことができた。

さらに、以下の手順で、*Eco* RIを用いて切断したファージDNAから、ホヤエンタクチンおよびその相補鎖のみを得た。

まず、1%低融点アガロースゲルを用い、エチジウムブロマイドおよびTAE (EDTA- トリス酢酸緩衝液) を含有する緩衝液系において、*Eco* RIで切断したファージDNAの電気泳動を行なった。泳動後、トランスイルミネーターでUV照射し、分子量 1.2kp (1.2キロベースペア) に相当する

- 43 -

このDNAはホヤエンタクチン遺伝子であり、この遺伝子およびその相補鎖を用いることによりホヤエンタクチンを製造することが可能である。

<実施例5>

ホヤエンタクチンの製造

実施例4において調製されたホヤエンタクチン遺伝子を基にし、ストラテジーン社から市販されているイン・ビトロ・エクスプレス・トランスレーション・キットを用いてホヤエンタクチンを製造した。

また、実施例4の(3)において調製された、ホヤエンタクチン遺伝子を有するファージを大腸菌に感染させ、この大腸菌の培養液からホヤエンタクチンを精製した。

[発明の効果]

以上のように、この発明によると、ホヤエンタクチンに特異的に結合するモノクローナル抗体が提供される。このモノクローナル抗体を用いることにより、間接酵素抗体法、間接蛍光抗体法等によって、ニトロセルロース等の膜に移し取った蛋

- 45 -

白質群、ELISAプレートに吸着した蛋白質群、切片をはじめとする組織標本などからホヤエンタクチンのみを容易に検出することが可能となる。また、エンタクチンは基底板のよい指標となる蛋白質であるため、ホヤの基底板の局在をも容易に検出することが可能になる。

また、この発明によると、ベクターに組み込んで宿主細胞に導入することにより、宿主細胞にホヤエンタクチンを産生させることを可能にするホヤエンタクチン遺伝子が提供される。

さらに、この発明によると、培養基板にコーティングすることにより細胞の増殖の促進を可能にし、および動物門間におけるエンタクチンの構造の比較検討を行なうことを可能にするホヤエンタクチンが提供される。

- 44 -

4. 図面の簡単な説明

第1図はホヤ体壁筋ホモジネートのSDS-PAGEによる展開パターンおよびモノクローナル抗体AS971の特異性を示す写真、第2a図はホヤ体壁筋ホモジネートの2次元電気泳動による展開パタ

第1図はホヤ体壁筋ホモジネートのSDS-PAGEによる展開パターンおよびモノクローナル抗体AS971の特異性を示す写真、第2a図はホヤ体壁筋ホモジネートの2次元電気泳動による展開パタ

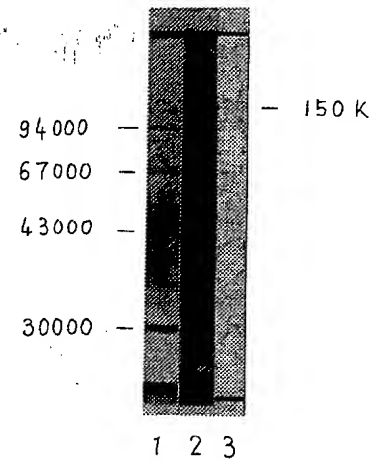
4. 図面の簡単な説明

第1図はホヤ体壁筋ホモジネートのSDS-PAGEによる展開パターンおよびモノクローナル抗体

AS971の特異性を示す写真、第2a図はホヤ体壁筋ホモジネートの2次元電気泳動による展開パタ

- 46 -

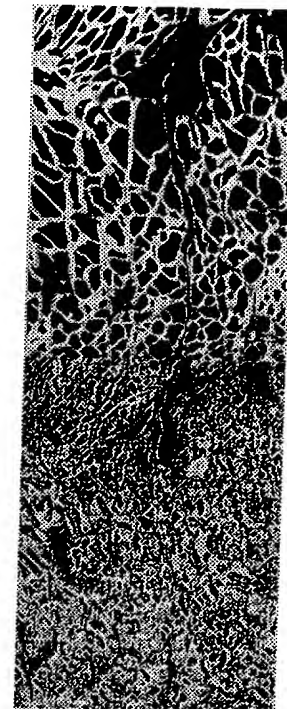
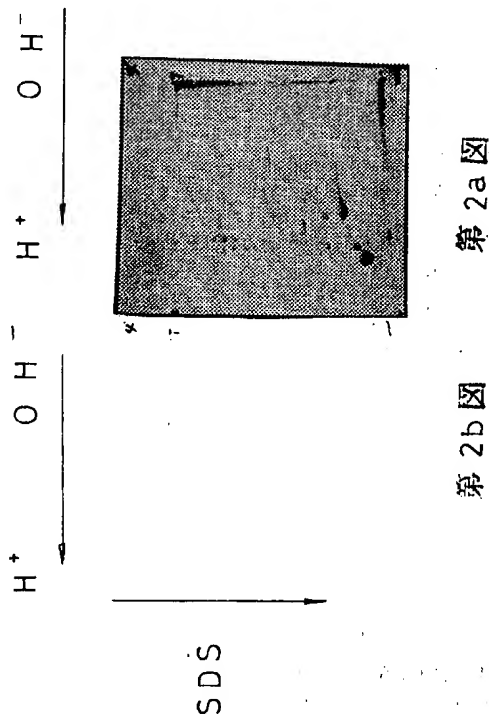
ーンを示す写真、第2b図は第2a図に示す展開パターンに対するモノクローナル抗体 AS971の特異性を示す写真、第3図はモノクローナル抗体 AS971に含まれるペプチドのアミノ酸配列を示す図、第4図はモノクローナル抗体 AS971が特異的に結合する蛋白質に含まれるペプチドのアミノ酸配列と、ラットエンタクチンに含まれるペプチドのアミノ酸配列とを比較する図、第5a図はホヤ体壁筋切片におけるエンタクチンの局在を示す位相差顕微鏡写真、第5b図はホヤ体壁筋切片におけるエンタクチンの局在を示す蛍光顕微鏡写真、第6図はホヤエンタクチン遺伝子に含まれる塩基配列を相補鎖と共に示す図、および第7図は第6図に示すホヤエンタクチン遺伝子の塩基配列とホヤエンタクチンのアミノ酸配列との対応を説明する図である。



第 1 図

出願人代理人 弁理士 鈴江武彦

- 4 7 -



10 20
 MetGluLysValAlaLeuCysMetLeuAlaValPheAlaValGlyHisSerLeuLeuVal
 30 40
 GluAspPheTyrProPheAspArgGluAsnAspAsnLeuValProLysGlyAspSerGlu
 50 60
 SerSerProGlnProLysThrPheTyrAlaAsnCysIleLeuArgSerGluTyrAspSer
 70 80
 ValThrValHisThrAspGlyLeuTyrLeuGluAsnValGlyAlaAspThrAspGlyGlu
 90 100
 ValLeuLeuAlaArgLeuGlyProThrGlyAspThrGluLeuSerGlyAspIlePhePhe
 110 120
 ArgGluHisLysAspAsnAlaThrIleAlaArgAlaAsnThrAspValArgGluAlaPhe
 130 140
 IleGluThrAlaGlyAspPheAsnAlaGlySerValPheValValThrTrpAspLysVal
 150 160
 GlnSerAlaSerArgGluAspGlyValThrPheThrPheGlnCysIleValAlaThrAsp
 170 180
 GlyAlaAlaThrPheAlaIlePheLeuTyrProGlnAspGlyLeuAlaValGlyGluAsn
 190 200
 AlaValLysGlyValArgAsnGluValThrAlaArgAlaGlyPheAsnAspGlyGlyArg
 210 220
 GluGlnLeuGluPheTyrArgLeuThrSerTyrLeuValValThrMetGlnValProArg
 225
 GlnTrpPheGlnIle

第 3 図

1' MEKVALCMLAVFAVGHSLLVEDFYFPDRENDNLVPGDSESSPQPKTFYANCILRSEYDS
 61' VTVHTDGLYLENVGADTDGEVLLARLGPTGDTLSGDIFFREHKDNATIA RANTDVREAF
 * * * * *
 1" EFHPGTFPPSFGSVAPFLADLDTDGLGNVYYREDLSPFIIQMAAEYVQRGF
 121' IETAGDFNAGSVFVVTWDKV-----QSASREDGVTFTFQCIVATDGAATFAIFLYPQDG
 * * * * *
 53" PE--VSFQPTSVVVVTWESMAPCGGPSGLVEEGKRNTFQAVLASSNSSSYAIFLYPDDG
 175' LAVGENAYKGYRNEVTARAGFNDGGREQLFYRLTSYLVVTMQVPRQWFQI
 * * * * *
 111" LQFFTTFSKKDENQVPAVVGFSKGLGFLWKSNGAYNIFANDRESMEDLAKSSNACHQGV
 171" WVFEIGSPATAKGVVPADVNLVDYDDGADYEDYDLQTSHLGLEDVATQPFPSHSPRRG
 231" YDPHNVPRTLVC

第 4 図

```

1      11      21      31      41
ATGGAGAAGG TAGCGTTGTG TATGCTAGCA GTATTTGCTG TTGGACATTC
TACCTCTTCC ATCGCAACAC ATACGATCGT CATAAACGAC AACCTGTAAG

51      61      71      81      91
GCTACTTGTG GAAGATTCTT ATCCGTTTGA CCGGGAAAAC GACAACTTAG
CGATGAACAC CTTCTAAAGA TAGGCAAGCT GGCCCTTTTG CTGTTGAATC

101     111     121     131     141
TACCAAAAGG CGATAGTGAA AGTTCACCTC AACCAAAAAC TTTCTATGCC
ATGGTTTTCC GCTATCACTT TCAAGTGGAG TTGGTTTTTG AAAGATACGG

151     161     171     181     191
AATTGTATTC TACGATCAGA ATATGACAGC GTAACCGTTC ATACAGATGG
TTAACATAAG ATGCTAGTCT TATACTGTCT CATTGGCAAG TATGTCTACC

201     211     221     231     241
TTTATACTTG GAAAACGTCG GAGCAGATAC AGACGGCGAG GTCTTGTTAG
AAATATGAAC CTTTTGCAGC CTCGTCTATG TCTGCCGCTC CAGAACAATC

251     261     271     281     291
CACGTTTAGG TCCGACTGGG GACACCGAGC TCTCGGGAGA TATCTTCTTC
GTGCAAAATCC AGGCTGACCC CTGTGGCTCG AGAGCCCTCT ATAGAAGAAG

301     311     321     331     341
AGAGAACACA AAGACAACGC TACTATAGCA AGGGCCAATA CCGACGTGAG
TCTCTTGTGT TTCTGTTGCG ATGATATCGT TCCCGGTTAT GGCTGCACTC

351     361     371     381     391
AGAAGCATTG ATTGAAACAG CAGGGGACTT CAATGCCGGC TCTGTCTTTG
TCTTCGTAAG TAACTTTGTC GTCCCTGAA GTTACGGCCG AGACAGAAAC

401     411     421     431     441
TTGTTACCTG GGATAAAGTA CAAAGTGCTA GTCGAGAGGA CGGGGTCACA
AACAAATGGAC CCTATTTCAT GTTTCACGAT CAGCTCTCCT GCCCCAGTGT

451     461     471     481     491
TTCACATTCC AGTGCATTGT CGCAACTGAC GGTGCGGCCA CCTTCGCAAT
AAGTGTAAGG TCACGTAACA GGGTTGACTG CCACGCCGGT GGAAGCGTTA

501     511     521     531     541
ATTTCTCTAT CCCCAAGACG GTCTAGCGGT CGGAGAAAAT GCAGTGAAGG
TAAAGAGATA GGGGTTCTGC CAGATCGCCA GCCTCTTTTA CGTCACTTCC

551     561     571     581     591
GAGTAAGGAA TGAAGTAACA GCCCGAGCCG GGTTC AATGA CGGAGGTCGA
CTCATTCTT ACTTCATTGT CGGGCTCGGC CCAAGTTACT GCCTCCAGCT

601     611     621     631     641
GAACAATTGG AATTCTATCG GCTGACGAGT TACTTGGTGG TGACAATGCA
CTTGTTAACC TTAAGATAGC CGACTGCTCA ATGAACCAAC ACTGTTACGT

651     661     671
GGTTCCAAGG CAATGGTTTC AAATT
CCAAGGTTCC GTTACCAAAG TTAA

```


10 20 30 40 50 60
 ATGGAGAAGGTAGCGTTGTGTATGCTAGCAGTATTTGCTGTTGGACATTTCGCTACTTGTG
 MetGluLysValAlaLeuCysMetLeuAlaValPheAlaValGlyHisSerLeuLeuVal

70 80 90 100 110 120
 GAAGATTTCTATCCGTTTCGACCGGGAAAACGACAACCTTAGTACAAAAGGCGATAGTGAA
 GluAspPheTyrProPheAspArgGluAsnAspAsnLeuValProLysGlyAspSerGlu

130 140 150 160 170 180
 AGTTCACCTCAACCAAAAACCTTTCTATGCCAATTGTATTCTACGATCAGAATATGACAGC
 SerSerProGlnProLysThrPheTyrAlaAsnCysIleLeuArgSerGluTyrAspSer

190 200 210 220 230 240
 GTAACCGTTTCATACAGATGGTTTATACTTGGAAAACGTCGGAGCAGATACAGACGGCGAG
 ValThrValHisThrAspGlyLeuTyrLeuGluAsnValGlyAlaAspThrAspGlyGlu

250 260 270 280 290 300
 GTCTTGTTAGCACGTTTAGGTCCGACTGGGGACACCGAGCTCTCGGGAGATATCTTCTTC
 ValLeuLeuAlaArgLeuGlyProThrGlyAspThrGluLeuSerGlyAspIlePhePhe

310 320 330 340 350 360
 AGAGAACACAAAGACAACGCTACTATAGCAAGGGCCAATACCGACGTGAGAGAAGCATTC
 ArgGluHisLysAspAsnAlaThrIleAlaArgAlaAsnThrAspValArgGluAlaPhe

370 380 390 400 410 420
 ATTGAAACAGCAGGGGACTTCAATGCCGGCTCTGTCTTTGTTGTTACCTGGGATAAAGTA
 IleGluThrAlaGlyAspPheAsnAlaGlySerValPheValValThrTrpAspLysVal

430 440 450 460 470 480
 CAAAGTGCTAGTCGAGAGGACGGGGTCACATTCACATTCAGTGCATTGTGCGCAACTGAC
 GlnSerAlaSerArgGluAspGlyValThrPheThrPheGlnCysIleValAlaThrAsp

490 500 510 520 530 540
 GGTGCGGCCACCTTCGCAATATTTCTCTATCCCAAGACGGTCTAGCGGTGCGGAGAAAAT
 GlyAlaAlaThrPheAlaIlePheLeuTyrProGlnAspGlyLeuAlaValGlyGluAsn

550 560 570 580 590 600
 GCAGTGAAGGAGTAAGGAATGAAGTAACAGCCGAGCCGGGTCAATGACGGAGGTGGA
 AlaValLysGlyValArgAsnGluValThrAlaArgAlaGlyPheAsnAspGlyGlyArg

610 620 630 640 650 660
 GAACAATTGGAATTCTATCGGCTGACGAGTTACTTGGTGGTGACAATGCAGGTTCCAAGG
 GluGlnLeuGluPheTyrArgLeuThrSerTyrLeuValValThrMetGlnValProArg

670
 CAATGGTTTCAAATT
 GlnTrpPheGlnIle

第 7 図

第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

// C 12 N 5/20
15/06
(C 12 P 21/08
C 12 R 1:91)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:19)